

β-淀粉酶 (β-AL) 活性检测试剂盒说明书 (DNS 显色法)

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2040

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 65 mL×1 瓶	常温保存
试剂二	液体 18 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

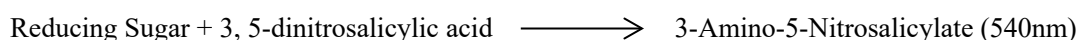
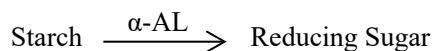
溶液的配制：

- 1、试剂一：若有黄色晶体析出，需加热溶解后再用；
- 2、试剂二：临用前取 1 支试剂三加入到 1 瓶试剂二中，置于常温水中并加热至煮沸，期间不断搅拌粉剂至溶解，用不完的试剂 2-8℃保存 4 周；
- 3、标准品：10 mg 无水葡萄糖。临用前加入 1 mL 蒸馏水配制成 10 mg/mL 的标准溶液，2-8℃保存两周。

产品说明：

淀粉酶负责水解淀粉，主要包括α-淀粉酶和β-淀粉酶。β-淀粉酶(EC 3.2.1.2) 从淀粉的非还原端切开α-1,4糖苷键，生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖。

还原糖还原3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质。α-淀粉酶不耐酸，β-淀粉酶不耐热。根据上述特性，钝化其中之一，就可测出另一种淀粉酶的活力。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称取约 0.1g 样本，加入 0.8mL 蒸馏水，研磨匀浆；将匀浆倒入离心管中，提取液在室温下放置提取 15min，每 5min 振荡 1 次，使其充分提取；6000g，常温离心 10min，取上清液加蒸馏水定容至 10mL，摇匀，即淀粉酶原液。

吸取上述淀粉酶原液 1mL，加入 4mL 蒸馏水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于 (α+β) 淀粉酶总活力的测定。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。

2. 标准液的稀释: 将10mg/mL葡萄糖标准液用蒸馏水稀释为0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625mg/mL的标准溶液。

3. 标准液稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度 (mg/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (mg/mL)
1	10	100	900	1
2	1	200	800	0.2
3	0.2	500	500	0.1
4	0.1	500	500	0.05
5	0.05	500	500	0.025
6	0.025	500	500	0.0125
7	0.0125	500	500	0.00625

备注: 实验中每个标准管需 250μL 标准溶液。

4. 取2支EP管分别加入250μL淀粉酶原液和淀粉酶稀释液, 沸水浴5min, 分别作为α-淀粉酶对照管和总淀粉酶对照管使用。

5. 按操作表依次加入各试剂:

试剂名称 (μL)	α-淀粉酶活力测定		总淀粉酶活力测定		标准曲线测定	
	对照管	测定管	对照管	测定管	空白管	标准管
淀粉酶原液	250 (煮沸)	250	-	-	-	-
蒸馏水	-	-	-	-	250	-
标准溶液	-	-	-	-	-	250
置于70°C水浴锅中准确反应15min, 冷却至室温						
淀粉酶稀释液	-	-	250 (煮沸)	250	-	-
试剂二	-	250	-	250	-	-
置于40°C水浴锅中准确保温5min						
试剂一	500	500	500	500	500	500
试剂二	250	-	250	-	250	250

混匀, 沸水浴 10min, 在 540nm 下测定吸光度, 从左到右分别记为 A1、A2、A3、A4、A5 和 A6, 计算 $\Delta A_{\alpha} = A2 - A1$, $\Delta A_{\text{总}} = A4 - A3$, $\Delta A_{\text{标准}} = A6 - A5$ 。每个测定管需设一个对照管。标准曲线和空白管只需测 1-2 次。

三、酶活性计算

1. 标准曲线的绘制:

以标准液的浓度 (mg/mL) 为x轴, 对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为y轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA_{α} 代入方程得到 x_1 (mg/mL), $\Delta A_{\text{总}}$ 代入方程得到 x_2 (mg/mL)。

2. α-淀粉酶活性:

(1) 按照样本质量计算

单位定义: 每g组织每分钟催化产生1mg还原糖定义为1个酶活力单位。

α -淀粉酶活性(U/g 质量) = $x_1 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2 \times x_1 \div W$

(2) 按照蛋白质含量计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1mg还原糖定义为1个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(U/mg prot)}=x_1 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T=0.2 \times x_1 \div C_{\text{pr}}$$

3. 总淀粉酶活性计算：

(1) 按照样本质量计算

单位定义：每g组织每分钟催化产生1mg还原糖定义为1个酶活力单位。

$$\text{总淀粉酶活性 (U/g 质量)}=5 \times x_2 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T=10 \times x_2 \div W$$

(2) 按照蛋白质含量计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1mg还原糖定义为1个酶活力单位。

$$\text{总淀粉酶活性(U/mg prot)}=5 \times x_2 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T=x_2 \div C_{\text{pr}}$$

4. β -淀粉酶活性计算：

(1) 按照样本质量计算

单位定义：每g组织在反应体系中每分钟催化产生1mg还原糖定义为1个酶活力单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (U/g 质量)}=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}=(10 \times x_2 \div W)-(2 \times x_1 \div W)=(10 \times x_2-2 \times x_1) \div W$$

(2) 按照蛋白质含量计算

单位定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生1mg还原糖定义为1个酶活力单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (U/mg prot)}=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}=(x_2 \div C_{\text{pr}})-(0.2 \times x_1 \div C_{\text{pr}})$$

5：总淀粉酶稀释倍数，(4mL+1mL)/1mL=5；V样：加入反应体系中样本体积，0.25mL；V样总：提取液总体积，10mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min。

注意事项：

测定的吸光值大于1时，可以对样本进行适当稀释后测定。若吸光值过小，可以浓缩淀粉酶稀释液或者淀粉酶原液。

参考文献：

[1] Dzedzoave N T, Graffham A J, Westby A, et al. Influence of variety and growth environment on β -amylase activity of flour from sweet potato (*Ipomea batatas*) [J]. Food control, 2010, 21(2): 162-165.

相关系列产品：

BC0700/BC0705 淀粉含量检测试剂盒

BC0610/BC0615 α -淀粉酶(α -AL)活性检测试剂盒

BC0430/BC0435 ADPG焦磷酸化酶(AGP)活性检测试剂盒

